

Aus der Arbeitsgruppe Perinatale Medizin
der Freien Universität Berlin
(Leiter: Professor Dr. E. Saling)

**PYRUVATKINASE IM MENSCHLICHEN FRUCHT-
WASSER, IN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN DES
NEUGEBORENEN (PLASMA, URIN, TRACHEAL-
SEKRET) SOWIE IM WÖCHNERINNENPLASMA BEI
UNKOMPLIZIERTEN UND KOMPLIZIERTEN
SCHWANGERSCHAFTEN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Arzt Ralf Meraner
aus
Hamburg

1984



Aus der Arbeitsgruppe Perinatale Medizin der
Freien Universität Berlin
(Leiter: Professor Dr. E. Saling)

Pyruvatkinase im menschlichen Fruchtwasser, in Körperflüssig-
keiten des Neugeborenen (Plasma, Urin, Trachealsekret)
sowie im Wöchnerinnenplasma bei unkomplizierten und
komplizierten Schwangerschaften

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen der Freien Universität
Berlin

vorgelegt von
Arzt Ralf Meraner
aus Hamburg

Referent: Prof. Dr. G. Bacigalupo
Korreferent: Prof. Dr. E. Liss

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 27.03.1984

Meiner Frau

1. Mein Herz

Seite 1

2. Mein Leben mit dir

Seite 2

3. Mein Leben mit dir
Mein Leben mit dir

Seite 3

Meiner Frau

4. Mein Leben mit dir
Mein Leben mit dir

Seite 4

5. Mein Leben

Seite 5

6. Mein Leben

Seite 6

7. Mein Leben mit dir

Seite 7

8. Mein Leben mit dir

Seite 8

9. Mein Leben

Seite 9

10. Mein Leben

Seite 10



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite 1
2. Literaturüberblick zum Thema	Seite 3
3. Beschreibung der Patienten, des Materials und der Methodik	Seite 7
4. Eigene Untersuchungen, Tabellen, Graphiken, Kasuistik	Seite 15
5. Diskussion	Seite 37
6. Zusammenfassung	Seite 46
7. Abkürzungsverzeichnis	Seite 49
8. Literaturverzeichnis	Seite 50
9. Lebenslauf	Seite 62
10. Danksagung	Seite 63

1. Introduction

2. Objectives

3. Methodology

4. Results and Discussion

5. Conclusion

6. References

7. Appendix

8. Acknowledgements

9. Bibliography

10. Glossary

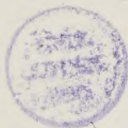
11. Index

1. Einleitung

Fruchtwasser, das Wasserbett des Feten, schützt vor mechanischen Einwirkungen. Es besteht zu 99% aus Wasser, im übrigen aus organischen und anorganischen Substanzen (4,5, 39,42). Der Liquor amnii, zu Beginn der Schwangerschaft wahrscheinlich vorwiegend ein Dialysat des maternalen und fetalen Plasmas, in der zweiten Schwangerschaftshälfte überwiegend ein Produkt des fetalen Harns, stellt ein dynamisches, biologisches Kompartiment dar, das in komplizierter Wechselwirkung mit Mutter und Kind verbunden ist (1,12,20,24,35,36, 37,38,57,58,62,63,69,80). Der Liquor bietet dadurch zahlreiche biologische Parameter, die eine Zustandsbeschreibung der fetoplacentaren Einheit erlauben. Es können somit Krankheitsbilder, z.B. genetischer oder immunologischer Natur erkannt werden, aber auch Lungenreifebestimmungen bzw. Reifebestimmungen des Feten durchgeführt werden (2,6,13,16,50, 51,74). Faßt man die Schwangerschaft als einen Tumor auf, so ist die diagnostische Amniozentese einer Biopsie vergleichbar (75). Dies mag die Tragweite von Fruchtwasseruntersuchungen verdeutlichen. So ist z.B. die vorgeburtliche Diagnose fetaler Schädigungen im Fruchtwasser aufgrund enzymatischer und chromosomaler Studien an kultivierten Fruchtwasserzellen im Rahmen der genetischen Fürsorge von zentraler Bedeutung.

Auch wenn Enzym- bzw. Enzymaktivitätsbestimmungen im Fruchtwasser nicht immer zur klinischen Anwendung gelangen, so liefern sie doch interessante Aspekte zur Entwicklung der fetoplacentaren Einheit. So zeigten z.B. WOLF und TAUSSIG (87) durch die Entdeckung der Amylase im Fruchtwasser, die mit derjenigen im neonatalen Urin identisch ist, daß um die 16. bzw. 18. Schwangerschaftswoche das fetale Pankreas und die Speicheldrüsen des Feten bereits in Funktion sind.-

Die Pyruvatkinase, ein überwiegend cytoplasmatisches Enzym,



ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse (61,71).

Aufgabe dieser Arbeit ist es, das Aktivitätsverhalten der Pyruvatkinase im Fruchtwasser im Verlauf der Schwangerschaft zu untersuchen und mit Hilfe von Ergebnissen von Zusatzuntersuchungen gedankliche Ansätze bezüglich der Herkunft des Enzyms in den Körperflüssigkeiten, speziell im Fruchtwasser zu diskutieren.

2. Literaturüberblick zum Thema

Wie erwähnt, ist die Pyruvatkinase ein Schlüsselenzym der Glykolyse (61,71); es wurde zuerst von LOHMANN und MEYERHOF entdeckt (41,47). Der zusammengesetzte optische Test zur Aktivitätsmessung des Enzyms, in der die Pyruvatkinase-Reaktion mit der der Laktatdehydrogenase gekoppelt ist, wurde von E. NEGELEIN (54) entwickelt. Negelein gewann die Pyruvatkinase in kristallisierter Form aus Rattenmuskeln. Die Protokolle und das Manuskript dieser Arbeiten gingen bei Kriegsende verloren, so daß in der Literatur lediglich ein Verfahren zur Gewinnung von Fermentkristallen aus menschlichem Muskel zu finden ist (32). Angaben zur Gewinnung gereinigter Präparate des Enzyms finden sich bei KACHMAR (26) und KORNBERG (30). Einen Aufsatz zur Isolierung mehrerer Enzyme wie Diphosphofructose-Aldolase, Milchsäure-Dehydrogenase, Pyruvatkinase u.a. aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang liefert BEISENHERZ (3). Als Enzym der Glykolyse ist die Pyruvatkinase im Cytoplasma lokalisiert; mitochondriales Vorkommen im Gehirn beschreibt FELLENBERG (14). Auch in zahlreichen anderen Geweben läßt sich die Pyruvatkinase nachweisen (67). Bei der progressiven Muskeldystrophie Duchenne ergeben sich nach anfänglichen Pyruvatkinase-Anstiegen in der Endphase der Krankheit signifikant erniedrigte Aktivitäten (33). TANAKA und VALENTINE konnten nachweisen, daß bei der nichtsphärozytären hämolytischen Anämie die Pyruvatkinase intraerythrozytär erniedrigt ist (79,82). Ein Screening-Test zur klinischen Diagnose dieses Enzymmangels existiert (55). Die Pyruvatkinase besitzt Isoenzymcharakter; Untersuchungen hierzu wurden von MARIE (55) durchgeführt. RADY und Mitarbeiter (60) berichten über Pyruvatkinase-Anstiege im Lungengewebe von Mäusen mit chemisch induzierten Tumoren.

Die Pyruvatkinase im Probenmaterial ist sehr instabil; so

konnten z.B. im menschlichen Leberextrakt Aktivitätsabnahmen schon nach 4 Stunden gemessen werden (66). Untersuchungen zu Pyruvatkinase-Normalwerten im menschlichen Plasma führten OTTO (56) und WIESSMANN (86) durch.-

Seit mehr als 40 Jahren ist bekannt, daß Enzyme wie z.B. die Laktatdehydrogenase, Creatinkinase, alkalische Phosphatase und andere auch im Fruchtwasser vorkommen (8). KOSTER und Mitarbeiter (31) untersuchten aus diagnostischer Zielsetzung heraus die Pyruvatkinase-Aktivität in kultivierten Fruchtwasserzellen; sie führten jedoch keine Aktivitätsbestimmungen im Fruchtwasser durch.

Nach meiner Kenntnis der einschlägigen Literatur liegen Pyruvatkinase-Untersuchungen im menschlichen Fruchtwasser bisher nicht vor.

Zum Verständnis enzymatischer Aktivitätsuntersuchungen im Fruchtwasser ist es notwendig, drei verschiedene Verfahren zu unterscheiden.

1. Untersuchungen an kultivierten Fruchtwasserzellen
(Zell- bzw. Gewebekulturen)
2. Untersuchungen isolierter Fruchtwasserzellen
(ohne Gewebekultivation)
3. Untersuchungen von zellfreiem Fruchtwasser

Ad 1

Hierbei gelingt es, verschiedene genetische Enzymdefekte in Zellkulturen nachzuweisen (17). Der Chromosomensatz und gewisse Stoffwechselleistungen der angezüchteten Zellen entsprechen weitgehend denen des Kindes in utero. Bei etlichen erblichen Stoffwechselstörungen ist auf diese Weise der pränatale Nachweis eines Enzymdefektes möglich (25). Die gemessenen Enzymaktivitäten in einer Kultur hängen von verschiedenen Faktoren wie Gestationsalter, Zellzyklus, Zelltypus und natürlich der Kulturtechnik ab (64).

Ad 2

Zur Untersuchung gelangen nichtkultivierte Fruchtwasserzellen (53). Die Glykogenose Typ 2 Pompe sowie die Sphingolipidose Tay-Sachs ließen sich als Enzymdefekt auf diese Art nachweisen (52,68).

Ad 3

Für diese Untersuchungen wird das Fruchtwasser durch Zentrifugation von den suspendierten Zellen getrennt. Der auf diese Weise gewonnene Überstand wird dann auf Enzymaktivität untersucht. Eine Übersicht über die bisher nachgewiesenen Enzyme findet sich bei BURTON (8) und LIND (36). Der Ursprung der im Fruchtwasser nachgewiesenen Enzyme ist teilweise nicht geklärt (18,19). Einige Enzyme entstammen wahrscheinlich vorwiegend dem Amnion (18). TÖRNQUIST erwägt für die Diamin-Oxidase als Ursprung die Dezidua; das Enzym soll dann durch Diffusion via Amniomembran in das Fruchtwasser gelangen (81). Der fetale Urogenitaltrakt stellt eine weitere potentielle Enzymquelle dar; wahrscheinlich gelangt die alpha-Glucosidase mit dem Urin in das Fruchtwasser (15,65). Entsprechendes gilt für die Amylase (87). Aber auch der Verdauungstrakt des Feten stellt eine Enzymquelle dar. POTIER und Mitarbeiter nennen in diesem Zusammenhang einige Disaccharidasen im Fruchtwasser (59). KLEINER und BROUET zeigen dies für die Oxytocinase (28).-

Bestimmte Enzymaktivitäten im Fruchtwasser können als Entscheidungshilfe in der klinischen Diagnostik herangezogen werden. So ist es z.B. möglich, die Amylase (10) oder die alkalische Phosphatase (78) als Parameter für die fetale Reifebestimmung zu nutzen. Beide Enzyme zeigen zum Ende der Schwangerschaft einen kräftigen Anstieg ihrer Aktivität.- Die Integrität der fetoplacentaren Einheit kann mittels der Diamin-Oxidase-Aktivität beurteilt werden. So schreiben z.B.

SOUTHREN (72) bzw. WEINGOLD (85), daß bei einer fetalen Gefährdung geringe Enzymaktivitäten bzw. Enzymaktivitätsabfälle auftreten. Ebenso zeigt das Pepsinogen im Fruchtwasser bei Gestosen und Erythroblastosen Aktivitätsminderungen (5). BRZEZINSKI (7) und KOREN (29) konnten nachweisen, daß die Monoamin-Oxidase des Fruchtwassers zu einer Verringerung des Serotonins und verschiedener Katecholamine führt. Dies wurde als ein Schutzmechanismus aufgefaßt, der den Feten vor Uteruskontraktionen bzw. Kontraktionen plazentarer Blutgefäße schützen solle. CHERRY und Mitarbeiter schreiben dem Lysozym-Gehalt des Fruchtwassers eine Rolle in der Bakteriostase zu (11). Bedeutsam ist natürlich auch die vorgeburtliche Diagnose von Entwicklungsstörungen und genetischen Krankheitsbildern. Das Hunter-Syndrom kann über das Verhalten der Sulfatase im Fruchtwasser erkannt werden (34). Auch Mißbildungen des Zentralnervensystems können durch Bestimmung der Acetylcholin-Esterase im menschlichem Fruchtwasser erkannt werden. Nicht zuletzt sei auf die thromboplastische Aktivität des Fruchtwassers hingewiesen, die bei der gefürchteten Fruchtwasserembolie zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung im mütterlichen Kreislauf führen kann (76).

3. Beschreibung der Patienten, des Materials und der Methodik

Die Schwangeren bzw. die Wöchnerinnen waren Patientinnen der geburtshilflichen Abteilung der Städtischen Frauenklinik Mariendorfer Weg. Die Neugeborenen und die Frühgeborenen lagen auf der Neugeborenenstation der Frauenklinik, im Kinderkrankenhaus des Krankenhauses Neukölln (örtlicher Bereich Mariendorfer Weg), sowie in der Kinderklinik Kaiserin Auguste Victoria Haus.

Sämtliche Patienten stellten innerhalb der Versuchsreihen ein unselektiertes Patientengut dar. Die Untersuchungen wurden in der Zeit vom 1.7.1981 bis zum 1.12.1981 vorgenommen. Zusätzliche Untersuchungen folgten im Juni und Juli 1982. Da die Pyruvatkinase im frischen Probenmaterial bestimmt werden mußte, stand ich bei den meisten Untersuchungen in telefonischem Kontakt mit der assistierenden Hebamme. So war gewährleistet, daß ich rechtzeitig die entsprechenden Untersuchungsvorbereitungen treffen konnte. Bei transzervikalen Fruchtwasserpunktionen und der Entnahme von Nabelvenenblut wurde ich über Hausfunk in den Kreißsaal gerufen.-

Das Trachealsekret erhielt ich von der Intensivstation des Kinderkrankenhauses. Die intubierten Kinder wurden alle 2 Stunden in meiner Gegenwart abgesaugt, so daß ich die Trachealsekrete sofort weiterverarbeiten konnte.

Fruchtwasserproben des Schwangerschaftszeitraumes 15. - 19. Woche

Bei den Punktionen wurden für meine Enzymuntersuchungen 2 ml Fruchtwasser transabdominal aspiriert. Fruchtwasserproben mit Blutbeimischungen, hämolytische Plasmaproben sowie Trachealsekrete mit Blutspuren wurden in keinem Falle untersucht. Anschließend erfolgte der Transport der im Eisbad gekühlten Spritze mit dem Fruchtwasser zum Labor.

Dieses Fruchtwasser füllte ich in Kunststoff-Zentrifugenröhrchen und zentrifugierte bei 2 bis 4 Grad Celsius 30 Minuten lang bei 3000 U/min. Der Überstand wurde abpipettiert, das Sediment verworfen. Danach erfolgten die Inkubation und die Messung.

Fruchtwasserproben des Schwangerschaftszeitraumes 24. - 34. Woche

Gleicher Arbeitsgang wie oben.

Fruchtwasserproben des Schwangerschaftszeitraumes 34. - 36. Woche

Da die Amniozentesen zwecks Lungenreifebestimmung in dem Zeitraum um die 36. Schwangerschaftswoche stattfanden, also infolge des erhöhten Volumens des Liquor amnii mehr Volumen aspiriert werden konnte, erhielt ich bei diesen Untersuchungen stets zwischen 10 und 20 ml Fruchtwasser. Ein Teil dieses Fruchtwassers wurde zur Amniokritbestimmung verwendet; der restliche Teil wie oben beschrieben verarbeitet. Die Amniokritbestimmung erfolgte in speziell kalibrierten Glaszentrifugenröhrchen; hierfür wurde 45 Minuten lang bei Raumtemperatur bei 5000 U/min zentrifugiert.

Fruchtwasserproben des Schwangerschaftszeitraumes 36. - 42. Woche

Das Fruchtwasser wurde transzervikal mit einer 20 ml Spritze durch Punktion der stehenden Fruchtblase gewonnen. Verunreinigtes Fruchtwasser (Desinfektionsmittel, Blut) wurde verworfen. Der weitere Arbeitsgang erfolgte wie oben beschrieben, unter gleichzeitiger Amniokritbestimmung. Grüne und/ oder mekoniumhaltige Fruchtwässer wurden in einer getrennten Versuchsreihe erfaßt.

Nabelvenenblut

Dieses Blut wurde aus der soeben ausgestoßenen Plazenta im Kreißsaal durch Punktion der Nabelvene in eine 10 ml Spritze aspiriert. Zur Gerinnungshemmung enthielt die Spritze 750 Einheiten Liquemin (Heparin); gerinnungshemmende Konzentration des Antikoagulans siehe Merck (46). Der Proben-transport zum Labor erfolgte wiederum im Eisbad; es wurde dann bei 2 bis 4 Grad Celsius 30 Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert.

Blut des 24 Stunden alten Neugeborenen

Vor der Blutentnahme wurde die zur Punktion vorgesehene Ferse des Neugeborenen mit einem warmen Wickel hyperämisiert. Durch 2 Lanzettenstiche in die desinfizierte Fersenhaut ließ ich das Blut in ein heparinisiertes Kunststoffröhrchen tropfen. Weiterer Arbeitsgang erfolgte wie oben beschrieben; jedoch wurde wegen der gesteigerten Hämolyse neigung des Neugeborenenblutes die Zentrifugation nur bei 1000 U/min für 20 Minuten bei 2 bis 4 Grad Celsius durchgeführt.

Venenblut von Kreißenden und Wöchnerinnen

Im Kreißsaal wurden zur Zeit der Eröffnungswehen von der Patientin 10 ml venöses Blut in eine heparinisierte Spritze aspiriert.- Im Wochenbett wurden erstmalig 24 Stunden später wiederum 10 ml venöses Blut entnommen. Dieser Vorgang wurde alle 24 Stunden bis zum 5.Tag nach der Entbindung wiederholt.

Urin von Neugeborenen mit erhöhten Pyruvatkinase-Werten im

Fruchtwasser

Der Urin der männlichen Neugeborenen wurde über einen pädiatrischen Urinauffangbeutel gesammelt. Nach Erhalt einer ausreichenden Portion wurde der Urin in ein Glasspitzröhrchen gefüllt und im Kühlschrank hinterstellt. Verunreinigter Urin wurde verworfen. Der Urin wurde dann bei 2 bis 4 Grad

Celsius bei 3000 U/min für 30 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, der Überstand abpipettiert und untersucht.

Urin von Kindern mit erhöhten Serum-Bilirubinwerten

Gleicher Arbeitsgang wie oben beschrieben.

Trachealsekret von Frühgeborenen bzw. Neugeborenen

Das Trachealsekret wurde Kindern der Intensivabteilung des Kinderkrankenhauses entnommen. Bei den Patienten lag ein Trachealtubus, durch den das Bronchialsystem alle 2 Stunden mittels eines 4 mm Ø Plastikkatheters freigesaugt wurde. Um das Trachealsekret gewinnen zu können, wurde vor jedem Absaugen der Tubus mit 0,9% Kochsalz-Lösung durchspült und danach das Sekret per Unterdruck abgesaugt. Dieses Sekret im Katheter spülte ich mit 2 ml Kochsalzlösung in ein Kunststoffröhrchen und zentrifugierte die Aufschwemmung bei 2 bis 4 Grad Celsius bei 3000 U/min für 30 Minuten. Außer der Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität wurde bei einem Teil der Trachealsekretproben ihr Lecithin-Gehalt bestimmt.

Mekonium-Zusatz zu pyruvatkinasehaltigem Fruchtwasser

Frisches Mekonium wurde in ein Plastikröhrchen gefüllt und im Labor dem Fruchtwasser zugesetzt. Dieses artefiziell mekoniumhaltige Fruchtwasser wurde dann 30 Minuten bei 3000 U/min bei 2 bis 4 Grad Celsius zentrifugiert.

Ultraschall-Versuch

Hierzu wurde Fruchtwasser von transabdominalen und transzervikalen Amniozentesen bei 3000 U/min und 2 bis 4 Grad Celsius 20 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Sediment in 5 ml 0,25 M Saccharose-Lösung suspendiert und nochmals unter obigen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abpipettiert; beschriebener Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das gewaschene Sediment wurde in 1 ml Aqua bidest aufgenommen und 4 mal 15 sec, sowie 8 mal 15 sec auf Stufe 3 des Sonikators zur Zellzer-

störung und Enzymfreisetzung behandelt.

Das ultraschallbehandelte Sediment und der Überstand wurden isoliert auf Pyruvatkinase-Aktivität untersucht.

Lyse-Versuch

1. Fruchtwasser der 34. - 36. Schwangerschaftswoche
Durch Zentrifugation gewonnenes Sediment des Fruchtwassers wurde mit 1 ml Aqua bidest aufgenommen. 100 microl dieser Aufschwemmung versetzte ich mit 400 microl Hämolyse-Reagenz.

2. Fruchtwasser der 36. - 42. Schwangerschaftswoche
Hierbei stellte ich aus zellreichem Fruchtwasser (Amniokritbestimmung) 3 gleiche Volumina her. Die erste Portion untersuchte ich wie üblich nach Zentrifugation auf Pyruvatkinase-Aktivität, während die zweite Portion mit Hämolyse-Reagenz versetzt wurde und die dritte Portion tiefgefroren wurde. Das tiefgefrorene Fruchtwasser wurde nach 24 Stunden auf Pyruvatkinase-Aktivität untersucht; das mit dem Hämolyse-Reagenz versetzte Fruchtwasser nach ca. 10 Minuten.

Aktivitätsverhalten der Pyruvatkinase im Fruchtwasser des Schwangerschaftszeitraumes der 36. - 42. Woche bei Raumtemperatur, bei 4 Grad Celsius und beim Tiefgefrieren

1. Raumtemperatur

Der nach Zentrifugation des Fruchtwassers gewonnene Überstand wurde zu gleichen Teilen auf 10 Plastikröhrchen verteilt. Diese Röhrchen wurden dann in eine thermostatische Kammer gestellt, die eine gleichbleibende Temperatur von 23 Grad Celsius über 24 Stunden garantierte. Die Pyruvatkinase-Aktivität wurde dann in bestimmten Zeitintervallen untersucht.

2. Eisbad

Hierzu erfolgte die gleiche Vorbereitung wie unter 1 beschrieben. Jedoch wurde das Halterack mit den Proben in ein Gefäß mit Eiswasser in den Kühlschrank gestellt. Die Pyruvatkinaseaktivität wurde ebenfalls in bestimmten Zeitintervallen untersucht.

3. Tiefgefriervorgang

Gleiche Vorbereitung wie unter 1. Danach wurden die Proben

in das Gefrierfach bei minus 14 Grad Celsius gestellt. Die Pyruvatkinase-Aktivität wurde ebenfalls in bestimmten Zeitintervallen untersucht.

Stabilisierungsversuch einer Fruchtwasser- bzw. Plasmaprobe bei Raumtemperatur

Der nach Zentrifugation gewonnene Überstand des Fruchtwassers bzw. das venöse Plasma wurde mit biochemischen Substanzen versetzt, die als Proteaseinhibitoren bzw. Enzymstabilisatoren gelten. Als Reagentien wurden verwendet:

8 Hydroxyquinoline Solution 0,34 M

Glutathione

alpha-1-Antitrypsin

2,3 Dimercaptopropanol

N-Ethylmaleimide

Trasylol (Aprotinin)

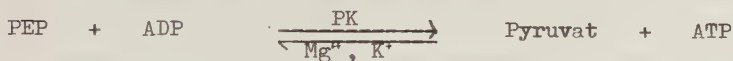
Es folgte die Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität in Zeitintervallen bei Raumtemperatur.

Kasuistik

Bei einer 25-jährigen V-para (1 lebendes Kind) mit der Diagnose einer RH-Inkompatibilität wurde parallel zur Antikörperbestimmung die Pyruvatkinase-Aktivität im Fruchtwasser bestimmt.

Methodik

Die Aktivitätsbestimmung der Pyruvatkinase (pyruvate 2-O-phosphotransferase; EC 2.7.1.40) erfolgte nach der von Gutman und Bernt (21) beschriebenen Methode. Folgende Reaktion wird durch die Pyruvatkinase katalysiert:



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite von Pyruvat und ATP (48); diese Reaktion wird mit einer zweiten gekoppelt:



Die auf diese Art umgesetzte Pyruvatmenge, gemessen an der Abnahme der NADH-Extinktion, ist ein Maß für die Pyruvatkinase-Aktivität. Diese Enzym-Aktivität wird in "Internationalen Einheiten" (Units) angegeben. Ein Unit (U) entspricht der Enzymaktivität, die unter definierten Bedingungen 1 micromol Substrat pro Minute umsetzt. Die "Internationale Einheit" wird auf 1 Liter Körperflüssigkeit bezogen. Daraus ergibt sich die Angabe der Aktivität in U/l bzw. mU/ml. Die Extinktion wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 365 nm gemessen. Die Meßkammer des Photometers ist auf 25 Grad Celsius thermostatiert. Ein Schreiber zur Registrierung der Extinktionsänderungen ist ebenfalls an das Photometer angeschlossen. Zur Extinktionsmessung wurden die Meßlösungen auf 25 Grad Celsius erwärmt; es wurde dann über zweimal 10 Minuten photometriert und registriert.

Fehler- und Qualitätskontrolle (46)

Bei auffälligen Meßergebnissen, wie erhöhten Pyruvatkinase-Aktivitäten, wurden Doppelbestimmungen des Probenmaterials durchgeführt. Die Präzisionskontrolle, d.h. die Genauigkeit der Methode wurde durch fünfmaliges Bestimmen der Pyruvatkinase-Aktivität einer Fruchtwasserprobe sowie einer Plasma-probe bei 4 Grad Celsius in Abständen einer halben Stunde an einem Tag durchgeführt. Hierdurch wurde die Steuerung in der Serie erfaßt. Um auch die Streuung von Tag zu Tag zu erfassen, wurde eine Kontrollprobe durch Lösen des lyophilisierten "Pyruvatkinase-Puders" in 3,2 molarer Ammoniumsulfatlösung hergestellt; durch entsprechendes Verdünnen wurde der Pyruvatkinasegehalt auf ca. 60 U/l eingestellt. 5 Kontrollproben wurden sofort untersucht; 5 weitere nach 24-stündiger Lagerung bei minus 14 Grad Celsius im Gefrierfach.-

Die Richtigkeit der Methode, d.h. die Wiederauffindung eines Wertes, wurde durch Bestimmen der Pyruvatkinase-Aktivität einer Probenflüssigkeit ermittelt, die durch Mischen zweier bekannter pyruvatkinasehaltiger Proben hergestellt worden war. Die Nachweisgrenze der Pyruvatkinase-Aktivität wurde durch entsprechende Verdünnungsschritte einer pyruvatkinasehaltigen Probenflüssigkeit mit 3,2 molarer Ammoniumsulfatlösung ermittelt. Die Untersuchung der verwendeten LDH auf eventuell vorhandene Pyruvatkinase-Aktivität führte zu keiner registrierbaren Pyruvatkinase-Aktivität.

Sämtliche Meßwerte wurden sofort protokolliert und in Tabellen zusammengefaßt. Der Reifebeurteilung des Neugeborenen wurden die Kriterien des Farr-Schemas zugrunde gelegt.

Die Meßwerte wurden über das Rechenzentrum der FU Berlin ausgewertet. Zur Darstellung kamen die Programme Frequencies, Scattergram und Crossteps. Die Daten sind unter dem Code 3PSS PYROZ1 gespeichert.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit 5% angesetzt.

4. Eigene Untersuchungen, Tabellen, Graphiken, Kasuistik

Tab. 1: Steuerung in der Serie

Genauigkeit der Methode (Präzisionskontrolle)

a) gemessene Pyruvatkinase-Aktivität (U/l) im Fruchtwasser

Ist-Werte: 28 27 26 27 28

Mittelwert: 27,2 Standardabweichung: 0,8

Variationskoeffizient: 3,1%

b) gemessene Pyruvatkinase-Aktivität (U/l) im Plasma

Ist-Werte: 10 10 9 11 10

Mittelwert: 10,0 Standardabweichung: 0,7

Variationskoeffizient: 7,1%

Beide Variationskoeffizienten sind kleiner als 10% und befinden sich innerhalb der Toleranz für Enzymaktivitätsbestimmungen.

Tab. 2: Wiederauffindung eines Wertes

Richtigkeit der Methode

a) Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität (U/l) einer Kontrollprobe 1 (Fruchtwasser) ergibt einen Ist-Wert=25 .

b) Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität (U/l) einer Kontrollprobe 2 (Fruchtwasser) ergibt einen Ist-Wert=10 .

c) Mischen der Probe 1 mit der Probe 2 im Verhältnis 1 + 1 ergibt einen Ist-Wert von 15 U/l und einen Soll-Wert von 17,5 U/l.

Diese Tabelle zeigt, daß bei der Wiederauffindung eines Wertes der Ist-Wert um minus 2,5 U/l vom Soll-Wert abweicht.

Die prozentuale Abweichung (14%) des Meßwertes vom Sollwert darf den dreifachen Variationskoeffizienten einer Serie nicht, auf keinen Fall bei Enzymaktivitätsbestimmungen den Wert von 20% überschreiten.

Tab. 3: Nachweisgrenze der Pyruvatkinase-Aktivität (U/l)
im Fruchtwasser

Die entsprechenden Verdünnungen der aufgeführten Lösungen erfolgen mit 3,2 molarer Ammoniumsulfatlösung.

- a) Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität einer Fruchtwasserprobe (Lösung I) ergibt einen Ist-Wert von 58 U/l.
Verdünnung dieser Lösung I im Verhältnis 1:2 ergibt Lösung II
- b) Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität dieser Lösung II ergibt einen Ist-Wert von 25 U/l. (Soll-Wert: 29 U/l)
Verdünnung dieser Lösung II im Verhältnis 1:2 ergibt Lösung III
- c) Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität dieser Lösung III ergibt einen Ist-Wert von 12 U/l. (Soll-Wert: 14,5 U/l)
Verdünnung dieser Lösung III im Verhältnis 1:2 ergibt Lösung IV
- d) Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität dieser Lösung IV ergibt einen Ist-Wert von 7 U/l. (Soll-Wert: 7,25 U/l)
Verdünnung dieser Lösung IV im Verhältnis 1:2 ergibt Lösung V
- e) Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität dieser Lösung V ergibt einen Ist-Wert von 3 U/l. (Soll-Wert: 3,6 U/l)
Verdünnung dieser Lösung V im Verhältnis 1:2 ergibt Lösung VI
- f) Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität dieser Lösung VI ergibt einen Ist-Wert von 1 U/l. (Soll-Wert: 1,8 U/l)
Verdünnung dieser Lösung VI im Verhältnis 1:2 ergibt Lösung VII
- g) Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität dieser Lösung VII ergibt einen Ist-Wert von 0 U/l. (Soll-Wert: 0,9 U/l)

Diese Tabelle 3 soll verdeutlichen, daß die Pyruvatkinase-Aktivität im Fruchtwasser in einer Verdünnungsserie bis zu einem Ist-Wert von 1 U/l nachzuweisen ist.

Tab. 4: Fruchtwässer des Schwangerschaftszeitraumes
15. - 19. Woche

lfd. Nr.	Pk-Akt. in U/l	SSW	Sed.	Farbe
01	0,0	16/0	-	gelbl.-klar
02	0,0	15/5	-	gelbl.-klar
03	0,0	15/3	-	gelbl.-klar
04	<u>1,0</u>	19/2	-	gelbl.-klar
05	0,2	16/3	-	gelbl.-klar
06	0,0	16/1	-	gelbl.-klar
07	0,0	15/5	-	gelbl.-klar
08	0,5	16/0	-	gelbl.-klar
09	0,4	17/3	-	gelbl.-klar
10	0,0	16/3	-	gelbl.-klar
11	0,0	18/0	-	gelbl.-klar
12	0,0	16/0	-	gelbl.-klar
13	0,0	16/2	-	gelbl.-klar
14	0,0	15/5	-	gelbl.-klar
15	<u>0,8</u>	15/3	-	gelbl.-klar
16	0,0	17/6	-	gelbl.-klar
17	0,2	16/2	-	gelbl.-klar
18	0,4	15/3	-	gelbl.-klar
19	<u>1,2</u>	15/5	-	gelbl.-klar
20	<u>0,8</u>	17/2	-	gelbl.-klar

Dargestellt sind 20 Pyruvatkinase-Werte der Fruchtwässer des Schwangerschaftszeitraumes der 15. bis 19. Woche. Die Fruchtwässer wiesen kein Sediment auf; die Farbe des frischen Fruchtwassers war immer gelblich klar.

Definiert man Werte zwischen 0,0 bis 0,5 als 0 und Werte zwischen 0,6 bis 1,5 als 1,0 sowie Werte zwischen 1,6 bis 2,0 als 2,0, so sind lediglich 4 Meßwerte von 20 Meßwerten als noch gerade meßbar zu bezeichnen. (s.a. Nachweisgrenze Seite 16)

Tab. 5: Fruchtwässer des Schwangerschaftszeitraumes
24. - 34. Woche

lfd. Nr.	Pk-Akt. in U/l	SSW	Sed.	Fa
01	2,1	30/2	Spur	gelbl.-klar
02	0,0	24/6	Spur	gelbl.-klar
03	0,0	26/6	Spur	gelbl.-klar
04	1,5	32/2	Spur	gelbl.-klar
05	2,0	34/2	Spur	gelbl.-klar

Dargestellt sind 5 Pyruvatkinase-Werte der Fruchtwässer des Schwangerschaftszeitraumes der 24. bis 34. Woche. Die Fruchtwässer wiesen ein angedeutetes Sediment auf; die Farbe des frischen Fruchtwassers war immer gelblich-klar.

Tab. 6: Fruchtwässer des Schwangerschaftszeitraumes
34. - 36. Woche

lfd. Nr.	Pk-Akt. in U/l	SSW	Sed.	Fa
01	4,0	36/0	Spur	w-g-k
02	6,4	36/0	Spur	w-g-k
03	1,9	36/4	Spur	w-g-k
04	1,3	34/5	Spur	w-g-k
05	1,9	36/0	Spur	w-g-k
06	2,9	36/0	Spur	w-g-k
07	1,9	36/0	Spur	w-g-k
08	1,9	35/3	Spur	w-g-k
09	0,9	36/4	Spur	w-g-k
10	1,5	35/5	Spur	w-g-k
11	2,3	36/0	Spur	w-g-k
12	2,1	36/5	Spur	w-g-k

Dargestellt sind 12 Pyruvatkinase-Werte der Fruchtwässer des Schwangerschaftszeitraumes der 34. bis 36. Woche.

Die Fruchtwässer wiesen ein angedeutetes Sediment auf; die Farbe des frischen Fruchtwassers war immer weiß-gelblich-klar.

Tab. 7: Fruchtwässer des Schwangerschaftszeitraumes
36. - 42. Woche, sub partu entnommen

lfd.Nr.	Pk-Akt. in U/l	SSW	Amn.	Fa.	Maturität d. Kind. Vern.-I.	Pet.
01	50	40/0	3,2	WF	2	39
02	36	37/4	2,8	WF	1	40
03	15	39/1	1,5	WF	3	39
04	09	41/4	1,8	WF	1	38
05	20	40/0	5,1	WF	1	40
06	09	41/0	2,2	WF	1	40
07	74	39/6	1,8	WF	1	40
08	03	41/6	1,2	WF	2	40
09	10	40/6	1,8	WF	1	39
10	03	39/3	0,9	WF	2	39
11	11	39/5	1,8	WF	1	39
12	03	37/5	0,6	WF	2	36
13	131	40/1	3,7	WF	0	40
14	04	39/5	2,2	WF	2	40
15	09	38/4	2,5	WF	2	40
16	47	41/5	6,9	WF	1	39
17	17	40/3	2,8	WF	1	40
18	11	41/3	1,8	WF	2	40
19	67	40/2	2,3	WF	1	40
20	51	41/5	1,2	WF	1	39
21	78	38/5	1,8	WF	0	39
22	96	41/0	4,2	WF	1	40

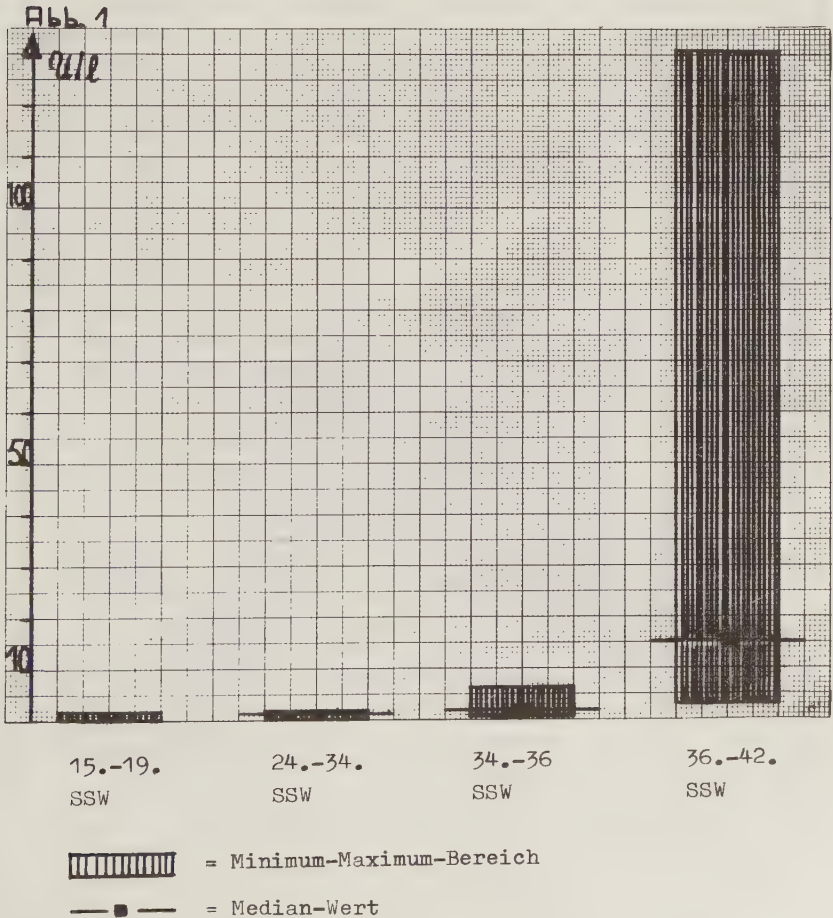
lfd.Nr.	Pk-Akt. in U/l	SSW	Amn.	Fa.	Maturität d. Kind.	
					Vern.-I.	Pet.
23	07	39/0	2,6	WF	2	39
24	23	36/3	2,2	WF	1	39
25	10	42/3	3,7	WF	1	40
26	19	39/0	0,9	WF	1	40
27	18	42/0	3,1	WF	2	40
28	08	40/2	3,1	WF	1	39
29	04	37/0	0,6	WF	3	38
30	11	38/1	1,4	WF	1	39
31	17	40/2	1,4	WF	1	40
32	17	39/4	0,6	WF	1	39
33	42	39/4	1,2	WF	1	40
34	17	38/2	1,8	WF	0	40
35	15	40/6	0,9	WF	1	40
36	06	40/3	2,3	WF	2	39

Dargestellt sind 36 Pyruvatkinase-Werte der Fruchtwässer des Schwangerschaftszeitraumes der 36. bis 42. Woche. Es handelt sich um transzervikale Fruchtwasserentnahmen sub partu. Das Sediment dieser Fruchtwässer wurde quantitativ durch den Amniokriten erfaßt. Die Farbe des frischen Fruchtwassers war immer weißlich; die Konsistenz flockig.

Tab. 8: Übersicht zum gesamten Schwangerschaftsverlauf

Zeitraum	15.-19.	24.-34.	34.-36.	36.-42.
Summe der untersuchten Fälle	SSW 20	SSW 5	SSW 12	SSW 36
Mittelwert	0,3	1,1	2,3	26,9
Median	0	1,5	1,9	15,5
Minimum	0	0	0,9	3
Maximum	1,9	2,1	6,4	131

Zeitraum	15.-19.	24.-34.	34.-36.	36.-42.
SSW	SSW	SSW	SSW	SSW
Summe der unters.Fälle	20	5	12	36
Modalwert	0	0	1,9	17,0
Bereich	1,9	2,1	5,5	128
Stand.Abw.	0,5	1,1	1,5	29,8
Varianz	0,2	1,1	2,3	885,8



Die Abbildung 1 sowie die Tabelle 8 verdeutlichen den Anstieg der Pyruvatkinase-Aktivität im gesamten Schwangerschaftsverlauf.

Tab. 9: Korrelationstabelle

Die Pyruvatkinase-Aktivität korreliert zu	Korrelation	Signifikanz
- <u>Vernix-Index</u>	-0,5	0,00095
- Petrusa	+0,2	0,07220
- Kindsgewicht	+0,2	0,13151
- Placentagewicht	-0,2	0,17495
- Nabelschnurlänge	+0,1	0,23672
- Alter der Mutter	-0,1	0,36269
- Para	-0,0	0,40335
- Schwangerschaftswoche	+0,1	0,23047
- <u>Amniokrit</u>	+0,4	0,01734

Die Pyruvatkinase-Aktivität im Fruchtwasser zum Zeitpunkt der Geburt zeigt eine signifikante negative Korrelation mit dem Vernix-Index, sowie eine signifikante positive Korrelation mit dem Amniokriten. Zu den anderen Parametern ergeben sich keine signifikanten Korrelationen.

Tab. 10: Gegenüberstellung der Pyruvatkinase-Aktivität im Fruchtwasser zum Zeitpunkt der Geburt der männlichen und weiblichen Neugeborenen ($p < 0,05$)

Mittelwert	männlich 33,0	weiblich 17,4
<u>Median</u>	männlich <u>17,0</u>	weiblich <u>9,5</u>
Modalwert	männlich 10,0	weiblich 3,0

Die Tabelle zeigt, daß die Parameter der männlichen Neugeborenen über denen der weiblichen Neugeborenen liegen.

Tab. 11: Die Pyruvatkinase-Aktivität (U/l) im Wöchnerinnen-Plasma

lfd. Nr.	sub partu	n- Stunden post partum				
		24	48	72	96	120
01	10	18	44	38	31	27
02	13	26	33	29	28	27
03	12	23	30	25	23	21
04	18	42	46	24	19	17
05	11	23	30	23	15	15

Abb. 2

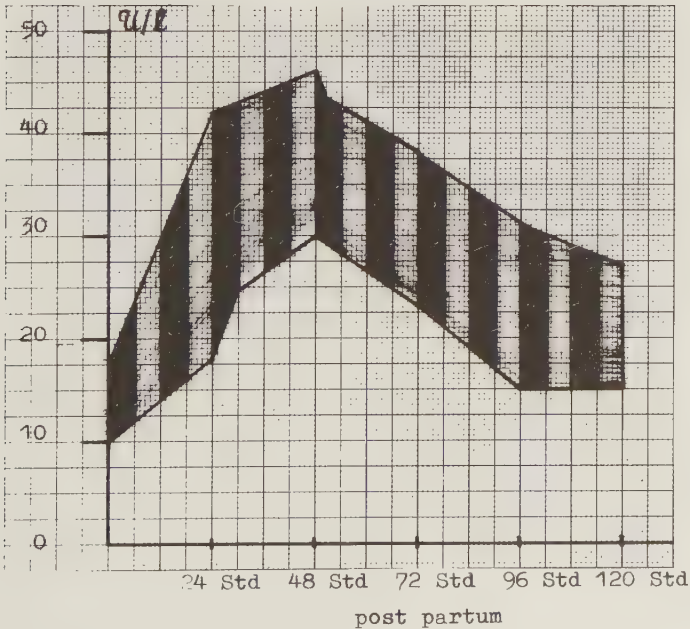


Tabelle 11 und Abbildung 2 verdeutlichen, daß das Maximum der Pyruvatkinase-Aktivität im Wöchnerinnen-Plasma nach 48 Stunden post partum erreicht ist.

Tab. 12: Gegenüberstellung der Pyruvatkinase-Aktivitäten (U/l) im Schwangerenplasma, im Fruchtwasser, im Nabelvenenplasma und im Neugeborenenplasma 24 Stunden post partum von 10 "Mutter-Kind-Paaren"

lfd. Nr.	Pyruvatkinase-Aktivität in U/l im ...			
	Schwangeren- plasma	Frucht- wasser	Nabelv.- plasma	Neugeborenen- plasma
01	18	20	40	48
02	13	11	24	30
03	15	131	20	27
04	13	47	36	37
05	22	67	25	32
06	14	23	30	40
07	19	10	25	29
08	17	18	38	48
09	21	4	27	35
10	20	17	19	28

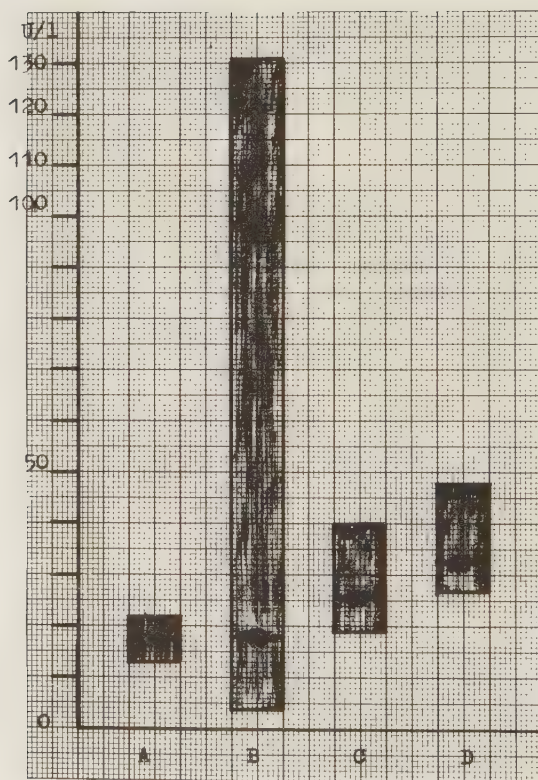
Tab. 13: Korrelationstabelle zu den Parametern dieser
10 "Mutter-Kind-Paare"

Pyruvatkinase-Aktivität im Neugeborenen-Plasma	<u>Korrelation</u>	<u>Signifikanz</u>
zu	0,93	0,00004
Pyruvatkinase-Aktivität im Nabelv.-Plasma		

Tabelle 12 und Tabelle 13 zeigen, daß bei den 10 "Mutter-Kind-Paaren" die Pyruvatkinase-Aktivität des Neugeborenenplasmas 24 Stunden post partum immer über den Werten des Nabelvenenplasmas liegt und fast linear hierzu korreliert ist.

Die übrigen Parameter der Tabelle 12 zeigten keine signifikanten Korrelationen.

Abb. 3: Graphische Darstellung der Medianwerte bzw. Minimum-Maximum-Bereiche der Pyruvatkinase-Aktivitäten der 10 Mutter-Kind-Paare im Schwangerenplasma, im Fruchtwasser, in Nabelvenenplasma und im Neugeborenenplasma 24 Stunden post partum



A= Schwangerenplasma

B= Fruchtwasser

C= Nabelvenenplasma

D= Neugeborenenplasma 24 Stunden post partum

 = Minimum-Maximum-Bereich

 = Median-Wert

Tab. 14: Die Pyruvatkinase-Aktivitäten im Urin Neugeborener, die erhöhte Pyruvatkinase-Aktivitäten im Fruchtwasser aufwiesen

lfd. Nr.	Pyruvatkinase-Aktivität in U/l im Urin	Fruchtwasser
01	2,3	131
02	0,8	78
03	0,0	96
04	0,0	51
05	0,0	67

Die Tabelle 14 zeigt, daß trotz hoher Pyruvatkinase-Aktivitäten im Fruchtwasser keine bzw. keine nennenswerten Pyruvatkinase-Aktivitäten im Urin zu messen sind.

Tab. 15: Die Pyruvatkinase-Aktivitäten im Urin von Kindern mit erhöhten Serum-Bilirubinwerten

lfd. Nr.	Pyruvatkinase-Aktivität (U/l) im Urin	Serumbilirubin- spiegel
01	0	18 mg/‰
02	0	19 mg/‰
03	0	21 mg/‰
04	0	24 mg/‰
05	0	20 mg/‰
06	0	15 mg/‰

Tabelle 15 zeigt, daß bei Kindern mit einem erheblichen, hämolytisch bedingtem Ikterus, keine Pyruvatkinase-Aktivität im Urin gemessen werden konnte.

Tab. 16: Untersuchung des Trachealsekretes von Früh- und Neugeborenen

lfd. Nr.	Trachealsekret- entnahme am... Tag post partum	Reifegrad des Kindes	Pk-Tr. U/l	Lec.-Tr. mg%
01	5	SSW 31	10	n. bestimmt
02	8	SSW 33	12	n. bestimmt
03	7	SSW 33	22	n. bestimmt
04	4	SSW 31	25	n. bestimmt
05	2	SSW 36	87	n. bestimmt
06	6	SSW 36	59	n. bestimmt
07	3	SSW 29	15	n. bestimmt
08	4	SSW 29	20	n. bestimmt
09	5	SSW 32	12	n. bestimmt
10	7	SSW 32	90	n. bestimmt
11	8	SSW 33	19	n. bestimmt
12	11	SSW 28	14	n. bestimmt
13	8	SSW 28	8	n. bestimmt
14	5	SSW 34	20	n. bestimmt
15	9	SSW 35	12	3,8
16	10	SSW 35	4	2,8
17	4	SSW 25	10	0,0
18	5	SSW 25	6	0,0
19	2	SSW 33	18	0,0
20	3	SSW 30	12	0,0

Diese Untersuchung (s. Tab. 16) lieferte keinen Zusammenhang zwischen der Pyruvatkinase-Aktivität im Trachealsekret und dem Reifegrad des Kindes bzw. zwischen der Pyruvatkinase-Aktivität im Trachealsekret und dem Lecithingehalt des Trachealsekretes.

Tab. 17: Übersicht zu den mekoniumhaltigen/grünen Fruchtwässern der 36. - 42. Schwangerschaftswoche, sub partu entnommen

lfd. Nr.	Pyruvatkinase-Aktivität in U/l	Farbe	mekonium- haltig
01	0	grün	+
02	0	grün	+
03	0	grün	+
04	0	grün	+
05	0	grün	+
06	0	grün	+
07	0	grün	+
08	0	grün	+
09	0	grün	+
10	0	grün	+
11	0	grün	+
12	0	grün	+
13	0	grün	+
14	0	grün	+
15	0	grün	+
16	0	grün	+
17	0	grün	+
18	0	grün	+
19	0	grün	+
20	0	grün	+

lfd. Nr.	Pyruvatkinase-Aktivität in U/l	Farbe	mekonium- haltig
21	0	grün	+
22	0	grün	
23	0	grün	
24	0	grün	+

Die Tabelle 17 zeigt, daß von 24 mekoniumhaltigen grünen Fruchtwässern, (davon 2 Fruchtwässer ohne makroskopisch sichtbares Mekonium) kein Fruchtwasser eine meßbare Pyruvatkinase-Aktivität aufwies.

Tab. 18: Versuch des Mekonium-Zusatzes zu pyruvatkinase-haltigem Fruchtwasser

lfd. Nr.	Pyruvatkinase-Aktivität U/l im Fruchtwasser vor...	nach Mekonium-Zusatz
01	15	0
02	19	0
03	12	0
04	11	0
05	47	0

Die Tabelle 18 zeigt, daß die im Fruchtwasser vorhandene Pyruvatkinase-Aktivität nach Mekonium-Zusatz nicht mehr nachweisbar ist.

Tab. 19: Ultraschall-Versuch

lfd. Nr.	Pyruvatkinase-Aktivität U/l im	
	Fruchtwasser- Überstand	ultraschallbehandelten Sediment
01	0	0
02	0	0
03	0	0
04	0	0
05	0	0

Tabelle 19 zeigt, daß nach 3-maligem Waschen des Fruchtwasser-Sedimentes weder im Überstand noch im ultraschallbehandelten Sediment Pyruvatkinase-Aktivität zu messen war.

Tab. 20: Lyse-Versuch

Schwanger schaftsww.	Sediment	Pyruvatkinase-Aktivität U/l in...		
		Fruchtw.- Überstand	Sed.-W.-A. nach H.-R. Zugabe	Gefrieren
36/0	Spur	4,0	0	0
35/4	Spur	1,9	0	0
36/3	Spur	2,5	0	0

Die Tabelle 20 zeigt, daß sich aus Fruchtwässern des Schwangerschaftszeitraumes der 35. bis 36. Woche keine zusätzliche Pyruvatkinase-Aktivität aus dem Sediment durch

Zugabe des Hämolyse-Reagenzes oder durch den Gefriervorgang freisetzen ließ.

Tab. 21: Lyse-Versuch

Schwanger schaftsw.	Amniokrit	Pyruvatkinase-Aktivität U/l in...		
		Fruchtw.- Überstand	Fruchtwasser nach H.-R. Zugabe	Gefr.
40/1	4,3	18	25	26
39/4	4,6	22	32	35
39/6	2,2	12	10	12
40/4	2,9	10	10	9
40/2	5,2	26	38	40

Die Tabelle 21 zeigt, daß sich bei einigen zellreichen Fruchtwässern mit einem entsprechend höheren Amniokriten zusätzliche Enzymaktivität aus dem Zellsediment durch Hämolyse-Reagenz-Zugabe bzw. durch den Gefriervorgang freisetzen ließ.

Tab. 22: Pyruvatkinase-Stabilisierungsversuch im Fruchtwasser und Plasma bei Raumtemperatur

Zeitpunkt	Pyruvatkinase-Aktivität U/l im													
	Fruchtwasser mit d. Zusatz							Plasma mit dem Zusatz						
	n	a	b	c	d	e	f	n	a	b	c	d	e	f
Std. 0	24	24	23	24	24	23	22	18	18	18	17	17	18	17
Std. 1	23	24	20	22	22	23	23	16	17	18	18	15	16	16
Std. 2	19	18	19	20	20	21	19	12	14	14	13	11	12	11
Std. 4	16	15	14	16	15	14	12	7	6	8	9	6	7	7
Std. 8	5	6	3	5	6	4	3	4	5	5	4	3	3	4

Zusatz n: natives Fruchtwasser bzw. Plasma

Zusatz a: 8 Hydroxyquinoline Solution 0,34 m; 10 microl.

Zusatz b: Glutathion (1 Spatelspitze)

Zusatz c: alpha-1-Antitrypsin (1 Spatelspitze)

Zusatz d: 2,3 Dimercaptopropanolol 2% (10 microl)

Zusatz e: N-Ethylmaleimide (0,1 mol)

Zusatz f: Aprotinin (50 microl.) (Trasylol)

Tabelle 22 zeigt, daß es nicht möglich war, die Pyruvatkinase-Aktivität im Fruchtwasser und Plasma bei Raumtemperatur mit Protease-Inhibitoren bzw. Glutathion zu stabilisieren.

Tab. 23: Prozentuale Darstellung des Aktivitätsverhaltens der Pyruvatkinase im Fruchtwasser bei Raumtemperatur, bei 4 Grad Celsius im Eisbad sowie beim Tiefgefrieren

Temp.	lfd. Nr.	Prozentuale Pyruvatkinase-Aktivität (%) zum Gr. C. Zeitpunkt der Stunde ...											
		0	1	2	3	4	6	8	10	24	48	72	
23	01	100	100	100	100	100	80	30	0	-	-	-	
23	02	100	100	95	80	60	0	-	-	-	-	-	
23	03	100	100	100	95	90	75	10	0	-	-	-	
23	04	100	100	90	80	80	75	15	0	-	-	-	
23	05	100	100	100	100	95	80	10	0	-	-	-	
23	06	100	100	95	90	90	80	5	0	-	-	-	
4	01	100	100	100	-	100	-	100	85	0	-	-	
4	02	100	100	100	-	100	-	100	100	0	-	-	
4	03	100	100	100	-	100	-	80	60	0	-	-	
4	04	100	100	100	-	100	-	95	83	0	-	-	
4	05	100	100	100	-	100	-	100	90	0	-	-	
-14	01	100	-	-	-	-	-	-	-	100	100	5	
-14	02	100	-	-	-	-	-	-	-	100	75	0	
-14	03	100	-	-	-	-	-	-	-	100	0	-	
-14	04	100	-	-	-	-	-	-	-	90	25	0	

Tabelle 23 zeigt, daß die besten Lagerungsergebnisse bei 4 Grad Celsius im Eisbad bzw. beim Tiefgefrieren zu erzielen sind .

Tab. 24: Pyruvatkinase-Aktivität des lyophilisierten
Pyruvatkinase-Puders, gelöst in 3,2 molarer
Ammoniumsulfatlösung

lfd. Nr.	Pyruvatkinase-Aktivität U/l vor bzw. nach Lagerung bei - 14 Grad Celsius	
	Stunde 0	Stunde 24
01	57	54
02	52	48
03	58	50
04	55	41
05	54	49

Tabelle 24 zeigt, daß bei Verwendung des lyophilisierten
Pyruvatkinase-Puders, gelöst in 3,2 molarer Ammoniumsulfat-
lösung nach 24 Stunden trotz Gefrierlagerung bei -14 Grad
Celsius die Ausgangsaktivität zur Stunde 0 in keinem Fall
zu messen war.

Kasuistik

Frau El Derzi, M geb.: 04.08.1956
stationäre Behandlung 28.08. - 04.11.1981

am 19.05.1981 (7. SSW) irreguläre Antikörper Anti D
nachweisbar, Liss Coombs 1 : 64
positiv
am 16.09.1981 (25. SSW) Liss Coombs 1:500 positiv, im
Fruchtwasser 1:16 positiv
am 02.10.1981 intrauterine Transfusion von
50 ml O Rh neg. Ery.-Konz. in
die Bauchhöhle des Feten
am 27.10.1981 Sectio

Die Patientin wurde am 04.11.1981 aus der stationären Behandlung entlassen. Das Kind verstarb in der Kinderuniversitätsklinik am Heubnerweg (KAVH).

Die Fruchtwasserpunktionen wurden am 16.09.1981 und am 30.09.1981 durchgeführt. Das Fruchtwasser war beidemal geblich/klar; eine Pyruvatkinase-Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden.

Datum	Pk-Aktivität U/l	SSW	Sediment	Farbe
16.09.81	0	24/6	Spur	gelblich/klar
30.09.81	0	26/6	Spur	gelblich/klar

5. Diskussion

Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß im zellfreien Fruchtwasser die Aktivität der Pyruvatkinase bestimmt werden kann. Im ersten und zweiten Trimenon lassen sich keine nennenswerten Pyruvatkinase-Aktivitäten messen. Zum Ende des dritten Trimenons, etwa zu Beginn der 36. Schwangerschaftswoche wird das Enzym meßbar. Der Median-Wert von 1,9 steigt zum Ende der Schwangerschaft auf 15,5 an. Der Minimum-Maximum-Bereich steigt von 5,5 auf 128,0 an.

D.h. im Verlauf der Schwangerschaft steigt die Pyruvatkinase-Aktivität an, und zwar erst gering und dann steil im Zeitraum der 36. bis 42. Schwangerschaftswoche. Es sei erwähnt, daß die Fruchtwässer des Schwangerschaftszeitraumes der 15. bis 19. Woche, der 24. bis 34. Woche und der 34. bis 36. Woche in gewisser Hinsicht "Risikokollektiven" entstammen (genetische Untersuchungen werden in der 15. - 19. Woche durchgeführt, Antikörper-Untersuchungen unter anderem in der 24. - 34. Woche und Lungenreifebestimmungen der Feten in der 34. - 36. Woche), während die Fruchtwässer der 36. bis 42. Woche eher dem Normalkollektiv entsprechen, obwohl auch hier nur Patientinnen mit unter der Geburt noch stehender Fruchtblase zur Untersuchung gelangten, während Patientinnen mit bereits rupturierter Fruchtblase nicht in unsere Versuchsreihen aufgenommen wurden.

Außerdem sei darauf hingewiesen (s.a. methodischer Teil dieser Arbeit), daß die Fruchtwässer des ersten und zweiten Trimenons transabdominal bzw. die Fruchtwässer des dritten Trimenons, d.h. die unter der Geburt gewonnenen Fruchtwässer transzervikal entnommen wurden.

Ein alternatives Vorgehen in Bezug auf die Auswahl der Kollektive sowie die Wahl der Fruchtwasserpunktion wäre im Rahmen unserer Arbeit jedoch nicht zu verantworten gewesen.

Unseres Erachtens nach führen diese Gesichtspunkte zu keiner Beeinflussung der gemessenen Pyruvatkinase-Aktivitäten im Fruchtwasser.-

Im Zusammenhang mit dem Aktivitätsverhalten der Pyruvatkinase ist interessant, daß z.B. die alkalische Phosphatase (5) bis zum 7. Schwangerschaftsmonat in ihrer Aktivität ansteigt und dann bis zum Schwangerschaftsende hin konstante Werte zeigt. Das Pepsinogen hingegen tritt nicht vor dem 5. Schwangerschaftsmonat auf, zeigt dann aber zum Schwangerschaftsende hin ein stetes Ansteigen. Die Diamin-Oxidase (72, 85) sowie die Lysozym-Aktivität (11) zeigen ein stetes Ansteigen im Schwangerschaftsverlauf. Andere Enzyme wiederum, z.B. die alpha-Glucosidase zeigen steigende Aktivität in der Schwangerschaftsmittle und einen Aktivitätsabfall zum dritten Trimenon hin (9).-

Die Farbe der untersuchten Fruchtwasserproben ist zu Beginn der Schwangerschaft immer gelblich/klar und wechselt bis zur 36. Schwangerschaftswoche zu einem weiß-gelblichen klaren Farbton. Zu diesem Zeitpunkt läßt sich durch das Zentrifugieren ein nur sehr geringes Sediment gewinnen. Zum Schwangerschaftsende hin wird das Fruchtwasser flockig-weißlich, und das Zellsediment läßt sich mittels Amniokrit quantitativ bestimmen (Amniokrit: Anteil der korpuskulären Bestandteile des Fruchtwassers, ausgedrückt in Vol %).

Zum Beginn der Schwangerschaft weist das Fruchtwasser also einen geringen Zellbestand auf (23, 84), der dann aber mit zunehmender Schwangerschaftsdauer ansteigt (83). Aus dem relativ geringen Zellsediment der bis zur und einschließlich der 36. Schwangerschaftswoche gewonnenen Fruchtwasserproben läßt sich keine Pyruvatkinase-

Aktivität freisetzen. Erst gegen Ende der Schwangerschaft, also auch mit steigendem Zellgehalt, läßt sich bei einigen Fruchtwässern mit einem hohen Amniokriten Pyruvatkinase-Aktivität aus dem Zellsediment freisetzen. Dies deutet auf eine Beeinflussung der im Fruchtwasser zu messenden Enzymaktivität durch suspendierte lysierte Zellen hin. Die positive Korrelation der Pyruvatkinase-Aktivität mit dem Amniokriten deutet ebenfalls auf die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom suspendierten Zellgehalt des Fruchtwassers hin.

In dieser Arbeit wird versucht, die Pyruvatkinase-Aktivität im Fruchtwasser in Beziehung zu setzen mit dem Reifegrad des Feten bzw. der Schwangerschaftsdauer. Dabei läßt sich zeigen, daß der Vernix-Index des Kindes mit der Pyruvatkinase-Aktivität negativ korreliert ist. D.h., je niedriger der Vernix-Index, also je reifer das Kind, desto höher ist die Aktivität der Pyruvatkinase. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß die Pyruvatkinase-Aktivität im Fruchtwasser im Verlauf der Schwangerschaft ansteigt. Es sei jedoch bemerkt, daß sich zum Petrussa-Index keine signifikante Korrelation ergibt. Zu anderen Kriterien, wie Gewicht des Kindes, Nabelschnurlänge, Alter der Mutter und angegebene Schwangerschaftsdauer ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Korrelationen. Der Vergleich der Pyruvatkinase-Aktivitäten der männlichen Neugeborenen mit denen der weiblichen Neugeborenen ergab überraschender Weise einen höheren Mittelwert und Median-Wert bei den männlichen Neugeborenen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß die β -Glucuronidase durch Androgene beeinflusst wird und so die im Fruchtwasser bei männlichen Feten gemessenen Aktivitäten über denen der weiblichen liegen (27).

Patientinnen mit einer Rh-Inkompatibilität sowie mit Risikoschwangerschaften, z.B. Gestosen, Diabetes mellitus und

Kindshypotrophie zeigten keine erhöhten Pyruvatkinase-Aktivitäten im Fruchtwasser. So konnte auch GEYER (19) bei den von ihm untersuchten Fruchtwasserenzymen keinen Anhalt dafür gewinnen, daß Erythroblastosen bzw. pathologisch verlaufende Schwangerschaften zu diagnostisch verwertbaren Enzymaktivitätsveränderungen führen.

Welch möglicher Ursprung kann nun für die Pyruvatkinase im Fruchtwasser diskutiert werden?

1. die äußere Epidermis sowie die Schleimhautregionen des Feten (Mundschleimhaut, Konjunktivalschleimhaut, Vaginalschleimhaut)
2. der Urogenitaltrakt des Feten
3. die Nabelschnur
4. der gesamte innere Verdauungstrakt des Feten
5. das Amnionepithel

Ad 1

Zu einem Zeitpunkt der fetalen Entwicklung besteht die Oberfläche des Embryos aus einer einzelligen kubischen sog. Ektodermsschicht. Am Ende des ersten oder am Beginn des zweiten Monats bildet sich eine zweite oberflächliche Schicht platter Zellen, das sog. Periderm. Die Verhornung beginnt um den 5. Monat (73). Abgestoßene Peridermzellen und Hornschuppen, vermischt mit Haaren und Talgsekret bilden dann die Vernix caeseosa, die sich zur zweiten Schwangerschaftshälfte hin bildet, und um die 38. Schwangerschaftswoche sich wieder verringert. Die Pyruvatkinase ist erst nach dem Zeitpunkt der oberflächlichen Verhornung im Fruchtwasser meßbar. Eine Diffusion durch die Hautoberfläche ist somit wenig wahrscheinlich. Eher ist zum Ende der Schwangerschaft hin an einen Austritt des Enzyms in das Fruchtwasser aufgrund suspendierter bzw. abgeschilfter lysierter Zellen des Feten zu denken, da zu diesem Zeitpunkt das Zellsediment stark ansteigt und ebenso die Pyruvatkinase-Aktivität an-

steigt.

Ad 2

Um die 16. Schwangerschaftswoche ist beim Feten der Bronchialbaum erkennbar; die Alveolenentwicklung ist erst im 8. Lebensjahr abgeschlossen. Im Epithel der Trachea und der proximalen Bronchien lassen sich ab etwa der 14. Fetalwoche Becherzellen erkennen. Die Hauptbildungsperiode liegt zwischen der 14. und 28. Schwangerschaftswoche. Die Differenzierung der frühen zellulären Elemente der Drüsen in schleimig oder serös sezernierenden Zellen und die allmähliche Ausbildung von Sekreten charakteristischer chemischer Zusammensetzung beginnt nach der 26. Schwangerschaftswoche (49).

In dieser Arbeit konnte im Trachealsekret frühgeborener Kinder die Pyruvatkinase nachgewiesen werden. Es ist jedoch zu beachten, daß die zu diesem Zwecke untersuchten Kinder wegen respiratorischer Störungen bei fetaler Unreife über einen Trachealtubus beatmet wurden. Ein eventueller traumatischer Einfluß des Tubus sollte daher berücksichtigt werden. Bei einem mit einem Nasenkatheter versorgten Kind konnte jedoch die Pyruvatkinase-Aktivität auch aus dem Sekret im Oro-pharynx bestimmt werden.

Ein weiterer Faktor ist die punktuelle Trachealsekretentnahme im Gegensatz zu einem mehr kontinuierlichem Flüssigkeitsaustausch zwischen Trachealsystem und Fruchtwasser im mütterlichen Uterus. Festzustellen bleibt jedoch, daß von Frühgeborenen der 25. Schwangerschaftswoche bis zur 30. Schwangerschaftswoche im Trachealsekret deutliche Enzymaktivitäten gemessen werden konnten, während im gleichen Zeitraum im Fruchtwasser nur geringe bis keine Enzymaktivitäten vorhanden waren.

Der Lecithin-Gehalt des Trachealsekretes zeigte keine Abhängigkeit von der Pyruvatkinase-Aktivität im Trachealsekret.

Die Pyruvatkinase-Aktivität ließ sich zu einem Zeitpunkt bestimmen (etwa 25. Schwangerschaftswoche entsprechend dem Reifegrad des Frühgeborenen), an dem sich das Lecithin im Trachealsekret noch nicht nachweisen ließ.

Insgesamt gesehen stellt das Trachealsekret also eine Quelle für die Pyruvatkinase im Fruchtwasser dar. Der quantitative Beitrag für das Auftreten im Fruchtwasser ist nicht näher zu beschreiben.

Ad 3

Der Urogenitaltrakt des Feten stellt eine weitere mögliche Enzymquelle dar. Da der Urin als ein verändertes Dialysat des fetalen Plasmas verstanden werden kann, wäre ein Übertritt der Pyruvatkinase vom Plasma in den Urin und damit in das Fruchtwasser denkbar. In dieser Arbeit ließ sich lediglich in zwei Fällen eine geringe Pyruvatkinase-Aktivität im Urin ermitteln; sämtliche anderen Fälle ergaben keine Aktivität des Enzyms. Ebenso ließ sich bei Kindern mit erhöhten Bilirubin-Serum-Werten keine Pyruvatkinase-Aktivität im Urin messen. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu bedenken, daß der Urin während der Sammeldauer bestimmten Einflüssen, wie Temperatur, Zeit etc. unterliegt, die zu Veränderungen einer eventuell vorhandenen Enzymaktivität führen können. Der Urin wird über einen Urinauffangbeutel gesammelt und daher der Bettwärme über eine variierende Zeitspanne ausgesetzt. Erschwerend kommt das wenig enzymfreundliche biochemische Milieu des Urins hinzu (45). Einen nur geringen Beitrag des Urins als Enzymquelle sieht GEYER (18) bei den von ihm untersuchten Fruchtwasserenzymen. Da der fetale Urin zum Zeitpunkt der 20. Schwangerschaftswoche einen maßgebenden Anteil an der Fruchtwasserproduktion

innehat, in dieser Zeitspanne jedoch keine Pyruvatkinase-Aktivität im Fruchtwasser zu messen ist, kann der Urin als eine wesentliche Enzymquelle der Pyruvatkinase nicht angesehen werden.

Ad 4

Ein Vergleich der Pyruvatkinase-Aktivitäten des Nabelvenenplasmas mit denen der zugehörigen Fruchtwässer zeigte keine Abhängigkeit voneinander. Ebenso ergab sich keine Abhängigkeit der Pyruvatkinase-Aktivität im Fruchtwasser vom Plazentagewicht und der Nabelschnurlänge. Ein eventueller Stoffaustausch zwischen Nabelschnur und Fruchtwasser verläuft auch eher in Richtung auf eine Resorption vom Fruchtwasser in die Nabelschnur (44). Ein theoretisch denkbarer Übertritt der Pyruvatkinase von der Nabelschnur in das Fruchtwasser ist daher wenig wahrscheinlich.

Ad 5

Der innere Verdauungstrakt des Feten dürfte ebenfalls als Enzymquelle eine zu vernachlässigende Rolle spielen. Es zeigte sich nämlich, daß die grünen und/oder mekoniumhaltigen Fruchtwässer keine Pyruvatkinase-Aktivität aufwiesen. Dies zeigte sich auch sehr eindrucksvoll in vitro durch Zugabe frischen Mekoniums zu pyruvatkinasehaltigem Fruchtwasser. Die Enzymaktivität wurde hierdurch sofort auf 0 reduziert. Für diese Beobachtung scheint der Gehalt des Mekoniums an proteolytischer Aktivität verantwortlich zu sein (40,73). Andere Enzyme hingegen sind jedoch durchaus im Mekonium stabil bzw. sogar in erhöhter Aktivität nachweisbar (18,70).

Ad 6

Der Beitrag des Amnions zur Pyruvatkinase-Aktivität im Fruchtwasser ist in dieser Arbeit schwer zu beurteilen. Die von

GEYER (18) im Fruchtwasser untersuchten Enzyme (Lactatdehydrogenase, Malatdehydrogenase u.a.) entstammen wahrscheinlich dem Amnion. Ein denkbarer Beitrag des Amnions wäre durch Zellsquamation und Zellyse zu erklären.-

Weiterhin zeigt diese Arbeit, daß die Pyruvatkinase-Aktivität des Nabelvenenplasmas post partum signifikant zur Pyruvatkinase-Aktivität des 24 Stunden alten Neugeborenenplasmas korreliert ist. Dabei liegen die im Neugeborenenplasma gemessenen Enzymaktivitäten etwas höher als die im Nabelvenenplasma. Dieser Sachverhalt könnte seine Ursache in einer verstärkten Erythrocytenmauerung des Neugeborenen, einer Zellschädigung durch Hypoxie beim fetalen Geburtsstress, sowie in einer eventuellen anfangs verminderten Enzymelimination des Neugeborenen haben.

Ein Zusammenhang zwischen im Plasma des mütterlichen venösen Blutes gemessenen Pyruvatkinase-Aktivitäten und denen im Fruchtwasser ließ sich nicht erkennen.

Hervorzuheben ist das Verhalten der Pyruvatkinase im venösen Plasma bei Wöchnerinnen, die über einen Gesamtzeitraum von 120 Stunden post partum beobachtet wurden. Hierbei ergab sich ein Anstieg der Pyruvatkinase-Aktivität bis zum 2. Tag nach der Entbindung mit Maximalwerten am 2. Tag. Der Anstieg betrug ungefähr das dreifache des Ausgangswertes im venösen Plasma während der Entbindung. Nach 120 Stunden waren die Anfangswerte noch nicht erreicht. Diese Ergebnisse widerspiegeln wahrscheinlich das Geburtstrauma in Bezug auf das Muskelorgan Uterus und zeigen durch fallende Enzymaktivitäten nach 48 Stunden post partum die beginnende Uterusinvolution an. SCHMIDT (67) weist in seiner Arbeit darauf hin, daß die Pyruvatkinase der Uterusmuskulatur in Ruhe und nach der Geburt unterschiedliche Werte mit höheren Aktivitäten nach der Geburt aufweist. Auch steigt die Pyruvatkinase bei gesunden Probanden nach körperlicher Anstrengung im Blut an (86). Zum Anstieg der Pyruvatkinase-Aktivität im venösen

Plasma bei Wöchnerinnen sei noch angemerkt, daß auch ein Einfluß der Hämokonzentration des Wöchnerinnenblutes in Erwägung gezogen werden muß.-

Die in-vitro Instabilität der Pyruvatkinase im Probenmaterial ist bekannt (16). In dieser Arbeit wurde versucht, das Enzym mit verschiedenen Zusätzen zu stabilisieren. Die Auswahl einiger Zusätze orientierte sich an der Arbeit von HOGAN (22). Es gelang jedoch nicht, die Pyruvatkinase im Fruchtwasser bzw. im Plasma zu stabilisieren. Der starke Aktivitätsverlust der Pyruvatkinase im Fruchtwasser ließ sich durch Kühlen im Eisbad bei 4 Grad Celsius vermindern, so daß die Anfangsaktivität noch nach maximal 12 Stunden zu messen war. Danach erfolgte ebenfalls der Aktivitätsabfall. Eine gewisse Stabilisierung ist auch durch Tiefgefrieren der biologischen Flüssigkeiten (Fruchtwasser, Plasma) zu erreichen; hierbei konnte die Ausgangsaktivität bis maximal 48 Stunden gehalten werden. Da jedoch Tiefgefrieren des Fruchtwassers beim Auftauvorgang zur Zellyse führt, muß vor dem Gefriervorgang die Trennung der zellulären Elemente vom Fruchtwasser gewährleistet sein. Gleiches gilt sinngemäß für die eventuelle Kältehämolysen bei Kühlung auf 4 Grad Celsius. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben führt zu Aktivitätsverlusten des Enzyms.

Kasuistik (Rh-Inkompatibilität)

Fruchtwasseruntersuchungen ermöglichen es, die Hyperbilirubinämie des Feten zu erkennen, da Bilirubin und Bilirubinoide in das Fruchtwasser gelangen. Mit einem Spektralphotometer mißt man die optische Dichte des Fruchtwassers und kann somit den Schweregrad der Rh-Inkompatibilität erkennen. Da eine verstärkte Schädigung fetaler Erythrocyten eventuell zu einer Pyruvatkinase-Aktivitätserhöhung im Fruchtwasser führen könnte, sollte die Pyruvatkinase-Aktivität bei einer Patientin mit einer Rh-Inkompatibilität im Fruchtwasser gemessen werden. Die Untersuchungen fielen in die 24. bzw. 26. Schwangerschaftswoche. Beide Male ließen sich jedoch keine Enzymaktivitäten messen.

6. Zusammenfassung

6.1. In der vorliegenden Arbeit wird erstmalig gezeigt, daß die Pyruvatkinase - ein glykolytisches, vorwiegend zytoplasmatisches Enzym - im menschlichen Fruchtwasser des 2. und 3. Trimenons vorhanden ist und während dieses Zeitraumes ansteigt. Die mittels UV-Test photometrisch bestimmten Enzymaktivitäten sind im 2. Trimenon gering; um die 36. Schwangerschaftswoche beginnt ein steiler Anstieg der Werte, der sich bis zur Geburt hin fortsetzt. Zum Zeitpunkt der Geburt zeigt die Pyruvatkinase-Aktivität im Fruchtwasser eine signifikante, positive Korrelation zum Amniokrit ($p < 0,05$), keine signifikante Korrelation zum Petrussa-Index, aber eine signifikante, negative Korrelation zum Vernix-Index ($p < 0,05$). -

Pyruvatkinase-Aktivitätsbestimmungen im Fruchtwasser können somit im Schwangerschaftsverlauf die biologische Entwicklung der fetoplazentaren Reifungseinheit enzymatisch charakterisieren und einen Beitrag zum Versuch leisten, Aspekte der fetalen Reifebestimmung aus enzymatischer Sicht zu beschreiben. Weitere Untersuchungen werden jedoch nötig sein, um insbesondere das Aktivitätsverhalten der Pyruvatkinase im dritten Trimenon weiter differenzieren und damit besser verstehen zu können.

6.2. Es wird vermutet, daß desquamierende und desquamierte Zellen der fetalen Epidermis, vielleicht auch des Amnion-epithels, in den letzten 4 Schwangerschaftswochen die Hauptquelle für die Pyruvatkinase-Aktivität im Fruchtwasser darstellen. Es zeigte sich, daß aus dem Fruchtwassersediment des Schwangerschaftszeitraumes der 35. bis 36. Woche experimentell keine zusätzliche Pyruvatkinase-Aktivität freigesetzt werden konnte; hingegen konnte bei einigen zellreichen Fruchtwässern mit einem entsprechend hohen Amniokriten des Schwangerschaftszeitraumes nach der 36. Woche durchaus zusätzliche Enzymaktivität freigesetzt werden.

Trachealsekretproben soeben geborener, intubierter Kinder zeigen hohe Pyruvatkinase-Aktivitäten, so daß auch die

Schleimhäute des Respirationstraktes bzw. deren Sekrete als Quelle der Pyruvatkinase im Fruchtwasser in Betracht gezogen werden müssen. Im ersten postpartualen Urin des Neugeborenen läßt sich keine oder keine nennenswerte Pyruvatkinase-Aktivität bestimmen; der präpartuale Fetalurin ist demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit keine wesentliche Quelle für die Fruchtwasser-Pyruvatkinase. Interessanterweise zeigen mekoniumhaltige Fruchtwasserproben keine Pyruvatkinase-Aktivität. Experimenteller Mekonium-Zusatz zu Fruchtwasserproben mit nachgewiesener Pyruvatkinase-Aktivität löscht die Enzymaktivität binnen kurzem.

6.3. Die Untersuchung von 2 Schwangerschaften mit schwerer Rh-Inkompatibilität lieferte keine Anhaltspunkte dafür, daß bei dieser Immunkrankheit Pyruvatkinase im Fruchtwasser vermehrt auftritt oder einen diagnostisch verwertbaren Anstieg zeigt.

6.4. Die Plasma-Pyruvatkinase-Aktivität des mehr als 24 Stunden alten Neugeborenen liegt immer deutlich höher als die Pyruvatkinase-Aktivität im Nabelvenen-Plasma desselben Kindes. Es liegt nahe zu vermuten, daß dieser Pyruvatkinase-Anstieg aus traumatischen und hypoxischen Zellschädigungen des Kindes sub partu und aus dem starken postpartualen Erythrozyten-Abbau beim soeben Neugeborenen resultiert.

6.5. Bei der Wöchnerin steigt die Plasma-Pyruvatkinase bis 48 Stunden nach der Geburt an und fällt danach allmählich ab.

6.6. Die Pyruvatkinase ist im Fruchtwasser und Blutplasma labil. Durch Aufbewahrung der Fruchtwasserproben bei 2 - 4 Grad Celsius, am besten im Eisbad, läßt sich die genuine Aktivität maximal 8 bis 12 Stunden lang unverändert erhalten. Durch

Einfrieren und Lagerung der Proben bei minus 10 bis minus 20 Grad Celsius läßt sich die genuine Aktivität von weitgehend zellfreiem Fruchtwasser noch nach 24 bis maximal 48 Stunden fast unverändert nachweisen.

Versuche zur Stabilisierung der Pyruvatkinase mit Protease-Inhibitoren schlugen fehl.

7. Abkürzungsverzeichnis

lfd. Nr.	- laufende Nummer
Pk-Akt. in U/l	- Pyruvatkinase-Aktivität in U/l
SSW	- Schwangerschaftswoche
Sed.	- Sediment
Fa.	- Farbe
gelbl.-klar	- gelblich-klar
Amn.	- Amniokrit
WF	- weiß/flockig
Reinheit d. Kind.	- Maturität des Kindes
Vern.-I.	- Vernix-Index
Pet.	- Petrusa
Pk-Tr.	- Pyruvatkinase im Trachealsekret
Lec.-Tr.	- Lecithin-Gehalt im Trachealsekret
Fruchtw.-Überstand	- Fruchtwasser-Überstand
Sed.-W.-A.	- Sediment-Wasser-Aufschwemmung
H.-R. Zugabe	- Hämolyse-Reagenz-Zugabe
Gefr.	- Gefrieren
Gr.C.	- Grad Celsius
n. bestimmt	- nicht bestimmt

8. Literaturverzeichnis

1. ABRAMOVICH, D.R.: The volume of amniotic fluid in early pregnancy.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 75 (1968) 728
2. ANDERSON, A. B. M., A. D. GRIFFITHS: Estimation of duration of gestation by amniotic fluid cytology
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 75 (1968) 300
3. BEISENHERZ, G., H. J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK, K.H. GARBADÉ, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang
Z. Naturforschg. 8b (1953) 555
4. BENZIE, R.J., T. A. DORAN, J. L. HARKINS, V. M. J. OWEN, C. J. PORTER: Composition of the amniotic fluid and maternal serum in pregnancy
Am. J. Obstet. Gynecol. 119 (1973) 798
5. BONSNES, R. W.: Composition of amniotic fluid
Clin. Obstet. Gynec. 9 (1966) 440
6. BROSENS, I., H. GORDON: The estimation of maturity by cytological examination of the liquor amnii
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 73 (1966) 88
7. BRZEZINSKI, A., Z. KOREN, Y. PFEIFER and F.G. SULMAN: The metabolism of serotonin in amniotic fluid
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 69 (1962) 661

8. BURTON, B. K., A. B. GERBIE and H. L. NADLER in FAIR-WEATHER, D. V. I. and T. K. A. B. ESKEs: Amniotic fluid Excerpta Medica 1978
9. BUTTERWORTH, J., D. M. Broadhead, G. R. SUTHERLAND, A. D. BAIN: Lysosomal enzymes of amniotic fluid in relation to gestational age
Am. J. Obstet. Gynecol. 119 (1974) 821
10. CASTRO, A. F., M. USATEGUI-Gomez, W. N. SPELLACY:
Amniotic fluid amylase
Am. J. Obstet. Gynecol. 116 (1973) 931
11. CHERRY, S. H., M. FILLER, H. HARVEY: Lysozyme content of amniotic fluid
Am. J. Obstet. Gynecol. 116 (1973) 639
12. DANFORTH, D. N., R. W. HULL: The microscopic anatomy of the fetal membranes with particular reference to the detailed structure of the amnion
Am. J. Obst & Gynec. 75 (1958) 536
13. DORAN, T. A., R. J. BENZIE, J. L. HARKINS, V. M. J. OWEN, C. J. Porter, D. W. THOMPSON, S. I. LIEGREN: Amniotic fluid tests for fetal maturity
Am. J. Obstet. Gynecol. 119 (1974) 829
14. FEELLENBERG, R., R. RICHTERICH, H. AEBI: Elektrophoretisch verschieden wandernde Pyruvatkinasen aus einigen Organen der Ratte
Enzymol. biol. clin. 3 (1963) 240
15. FLUHARTY, A. L., M.L. SCOTT, M.T. PORTER, H. KIHARA:
Acid alpha-glucosidase in amniotic fluid
Biochem. Med. 7 (1973) 39

16. FUCHS, F.: Genetic information from amniotic fluid constituents
Clin. Obstet. Gynec. 9 (1966) 565
17. GERBIE, A. B., S. B. MELANCON, C. RYAN, H. L. NADLER:
Cultivated epithelial-like cells and fibroblasts from amniotic fluid: Their relationship to enzymatic and cytologic analysis
Am. J. Obstet. Gynecol. 114 (1972) 314
18. GEYER, V. H.: Die Herkunft der Fruchtwasser-Enzyme
Z. klin. Chem. 8 (1970) 145
19. GEYER, V. H., SCHNEIDER, I., Enzyme im Fruchtwasser
Z. klin. Chem. 8 (1970) 141
20. GILLIBRAND, P. N.: Changes in the electrolytes, urea and osmolality of the amniotic fluid with advancing pregnancy
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 76 (1969) 898
21. GUTMANN, I., E. BERNT: Pyruvatkinase, Bestimmung der Aktivität in Serum und Erythrocyten
in Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse Band 1, 2. Auflage Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. 1970
22. HOGAN, P., L. H. REES, P. J. LOWRY, S. RATTER, E. J. SNITCHER:
Studies on the stability of human adrenocorticotrophin in blood and plasma
J. Endocrin. 71 (1976) 61
23. HOYES, A. D.: Ultrastructure of the cells of the amniotic fluid
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 75 (1968) 164

24. HUTCHINSON, D. L., M. J. GRAY, A. A. PLENTL, H. ALVAREZ,
R. CALDEYRO-BARCIA, B. KAPLAN, J. LIND: The role of the
fetus in the water exchange of the amniotic fluid of nor-
mal and hydramniotic patients
J. clin. Invest. 38 (1959) 971
25. KABACK, M. M., R. R. HOWELL: Infantile metachromatic
leukodystrophy heterozygote detection in skin fibroblasts
and possible applications to intrauterine diagnosis
New. Engl. J. Med. 282 (1970) 1336
26. KACHMAR, J. F., P. D. BOYER
J. biol. Chem. 200 (1953) 669
27. KAMARYT, J., P. MATYSEK: B-Glucoronidase activity in
amniotic fluid
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18 (1980) 611
28. KLEINER, H., BROUET-Yager, M.: Separation of L-cyctinyl-
DI-B-naphthylamide hydrolase (oxytocinase) isoenzymes of
human amniotic fluid by acrylamide gel electrophoresis
Clin. chim. Acta 45 (1973) 109
29. KOREN, Z.: The significance of monoamine oxidase in
amniotic fluid in human foetal development
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 74 (1967) 775
30. KORNBERG, A., W. I. PRICER
J. biol. Chemistry 193 (1951) 481
31. KOSTER, J. F., G. E. J. STAAL, M. F. NIERMEYER: Pyruvate
kinase in cultivated amniotic fluid cells
Clinica Chimica Acta 36 (1972) 572

32. KUBOWITZ, F., P. OTT: Isolierung von Gärungsfermenten aus menschlichen Muskeln
Biochemische Zeitschrift 317 (1944) 193
33. LAUDAHN, G.: Erkrankungen der quergestreiften Muskulatur in Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse Band 1, 2. Auflage Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. 1970
34. LIEBAERS, I., DI NATALE, P. and NEUFELD, E. F.:
Iduronate sulfatase in amniotic fluid: an aid in the prenatal diagnosis of the Hunter syndrome
J. Pediat. 90 (1977) 423
35. LIND, T., A. KENDALL, F. E. HYTTEN: The role of the fetus in the formation of amniotic fluid
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 79 (1972) 289
36. LIND, T.
in Documenta Geigy: Wissenschaftliche Tabellen, 8. Auflage S. 193 - 208
37. LIND, T., F. E. HYTTEN: Relation of amniotic fluid volume to fetal weight in the first half of pregnancy
The Lancet (1970) 1147
38. LIND, T., F. M. PARKIN, G. A. CHEYNE: Biochemical and cytological changes in liquor amnii with advancing gestation
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 76 (1969) 673
39. LIND, T., W. Z. BILLEWICZ, G. A. CHEYNE: Composition of amniotic fluid and maternal blood through pregnancy
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 78 (1971) 505

40. LISOWSKA-MYJAK, B. und L. TOMASZEWSKI: Trypsin Inhibitor and proteolytic activity in meconium and faeces during perinatal period of life
J. Clin. Chem. Clin. Biochem 19 (1981) 754
41. LOHMANN, K., O. MEYERHOF: Über die enzymatische Umwandlung von Phosphoglycerinsäure in Brenztraubensäure und Phosphorsäure
Biochemische Zeitschrift 273 (1934) 60
42. MAKEPEACE, J., A. W., F. FREMONT-SMITH, M. E. DAILEY, M. P. CARROL: The nature of the amniotic fluid
Surgery, Gynecology and Obstetrics 53 (1931) 635
43. MARIE, J., A. KAHN, P. BOIVIN: Pyruvate Kinase Isozymes in man
Hum. Genet. 31 (1976) 35
44. MARTIUS, G.: Lehrbuch der Geburtshilfe
9. Auflage Stuttgart Thieme 1977
45. MATTENHEIMER, H.: Enzyme im Urin
in Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse Band 1, 2. Auflage Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. 1970
46. MERCK, E.: Klinisches Labor
12. Auflage Darmstadt 1974
47. MEYERHOF, O., P. OHLMEYER, W. GENTNER, H. MAIER-LEIBNITZ: Studium der Zwischenreaktionen der Glykolyse mit Hilfe von radioaktivem Phosphor
Biochem. Z. 298 (1938) 396

48. MEYERHOF, O., P. OESPER: The enzymatic equilibria of phosphoenolpyruvate
J. biol. Chem. 179 (1949) 1371
49. MURRAY, J. F.: Die normale Lunge
1. Auflage Stuttgart, New York: Schattauer 1978
50. NADLER, H. L., A. B. GERBIE: Role of amniocentesis in the intrauterine detection of genetic disorders
The New England Journal of Medicine 282 (1970) 596
51. NADLER, H. L.: In utero detection of familial metabolic disorders Pediatrics 49 (1972) 329
52. NADLER, H. L., A. M. MESSINA: In utero detection of Type-II-Glycogenosis (Pompe's disease)
The Lancet (1969) 1277
53. NADLER, H. L., A. B. GERBIE: Enzymes in noncultured fluid cells
Am. J. Obst & Gynec. 103 (1969) 710
54. NEGELEIN s. BÜCHER, T., G. PFLEIDERER: Pyruvate kinase from muscle, Methods in Enzymology I,
Academic Press, New York 1955, S. 435
55. OTTO, P.: Blutkrankheiten
in Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse Band 1, 2. Auflage Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. 1970
56. OTTO, P., E. SCHMIDT, F. W. SCHMIDT: Enzymspiegel im Serum bei körperlicher Arbeit und ambulanten Patienten
Klin. Wschr. 42 (1964) 75

57. PARMLEY, T. H., A. E. SEEDS: Fetal skin permeability to isotopic water in early pregnancy
Amer. J. Obstet. Gynec. 108 (1970) 128
58. PLENTL, A. A., D. L. HUTCHINSON: Determination of deuterium exchange rates between maternal circulation and amniotic fluid
Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 82 (1953) 681
59. POTIER, M., DALLAIRE, L., S. B. MELANCON: Occurrence and properties of fetal intestinal glycosidases (disaccharidases) in human amniotic fluid
Biol. Neonat. (Basel) 27 (1975) 141
60. RADY, P., I. ARANY, E. UZVÖLGYI, F. BOJAN: Activity of pyruvate kinase and lactic acid dehydrogenase in mouse lung after transplacental exposure to carcinogenic and non-carcinogenic chemicals
Toxicology Letters, 8 (1981) 223
61. Rappoport, S. M.: Medizinische Biochemie
7. Auflage VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin 1977
62. REYNOLDS, S. R. M.: A source of amniotic fluid in the lamb: the naso-pharyngeal and buccal cavities
Nature (Lond.) 172 (1953) 307
63. REYNOLDS, W. A., R. M. PITKIN, A. A. HODARI: Transfer of iodide into amniotic fluid by the normal and the nephrectomized subhuman primate fetus
Am. J. Obst. & Gynec. 104 (1969) 633

64. RYAN, C. A., S. Y. LEE, H. L. NADLER: Effect of culture conditions on enzyme activities in cultivated human fibroblasts
Exp. Cell Res. 71 (1972) 388
65. SALAFSKY, I. S., H. L. NADLER: Alpha-1,4 glucosidase activity in Pompe's disease
The Journal of Pediatrics 79 (1971) 794
66. SCHMIDT, E., F. W. SCHMIDT: Untersuchungen über die Alterung von Enzymen in vitro
Enzymol. biol. clin. 3 (1963) 80
67. SCHMIDT, E. und F. W.: Enzym-Muster menschlicher Gewebe
Klin. Wschr. 38 (1960) 66
68. SCHNECK, L., C. VALENTI, D. AMSTERDAM, J. FRIEDLAND, M. ADACHI, B. W. VOLK: Prenatal diagnosis of Tay-Sachs disease
The Lancet (1970) 582
69. SCHRUEFER, J. F., A. E. SEEDS, R. E. BEHRMANN, A. E. HELLEGERS, P. D. BRUNS: Changes in amniotic fluid volume and total solut concentration in the rhesus monkey following replacement with distilled water
Am. J. Obstet. Gynecol. 112 (1972) 807
70. SEELEN, J. C.: Alkaline phosphatase activity in amniotic fluid in the second half of pregnancy
in Amniotic fluid Fairweather and Eskes, 2nd ed.
Excerpta Medica 1978

71. SIEGENTHALER, W.: Klinische Pathophysiologie
4. Auflage Thieme Verlag Stuttgart 1979
72. SOUTHREN, A. L., Y. KOBAYASHI, P. BRENNER, A. B. WEIN-
GOLD: Diamine-Oxidase activity in human maternal and
fetal plasma and tissues at parturition
J. appl. Physiol. 20 (1965) 1048
73. STARCK, D.: Embryologie
3. Auflage Thieme Verlag Stuttgart 1975
74. STEELE, M. W., W. R. BREG: Chromosome analysis of human
amniotic fluid cells
The Lancet (1966) 383
75. STETTEN, D.: Diagnosis of genetic disorders
in Amniotic fluid ed. by Natelson, S., 1974
76. STOLTE, L. A. M. et al.: Amniotic fluid embolism
in Fairweather, D. V. I. and T. K. A. B. Eskes:
Amniotic fluid Excerpta Medica 1978
77. SUTCLIFFE, R. G., D. J. H. BROCK: Observations on the
origin of amniotic fluid enzymes
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 79 (1972) 902
78. SUTCLIFFE, R. G., BROCK, D. J. H., J. G. ROBERTSON,
J. B. SCRIMGEOUR, J. M. MONAGHAN: Enzymes in amniotic
fluid: a study of specific activity patterns during
pregnancy
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 79 (1972) 895
79. TANAKA, K. R., VALENTINE, W. N., S. MIWA: Pyruvate kinase
deficiency hereditary nonspherocytic hemolytic anemia
Blood 19 (1962) 267

80. THOMAS, C. R., E. K. LANG, F. P. LANG: Fetal pyelography - a method for detecting fetal life
Obstetrics and Gynecology 22 (1963) 335
81. TÖRNQUIST, A., F. JONASSEN, P. JOHNSON, A. - M. FREDHOLM: Studies on Diamine oxidase activity during pregnancy
Acta Obstet Gynec Scand 50 (1971) 79
82. VALENTINE, W. N., K. R. TANAKA, S. MIWA: A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect (Pyruvate Kinase) in three subjects with congenital non-spherocytic hemolytic anemia
Transactions of the Association of American Physicians (Philadelphia) 74 (1961) 100
83. VOTTA, R. A., C. BOBROW, O. PARADA, M. GIULIETTI: Cytologic study of amniotic fluid in pregnancy
Am. J. Obst. & Gynec. 102 (1968) 571
84. WACHTEL, E., H. GORDON, E. OLSEN: Cytology of amniotic fluid
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 76 (1969) 596
85. WEINGOLD, A. B., A. L. SOUTHREN: Diamine oxidase as an index of the fetoplacental unit
Obstetrics and Gynecology 32 (1968) 593
86. WIESSMANN, U., O. TÖNZ, R. RICHTERICH, P. VERGER: Die Erythrocyten-Pyruvatkinase bei Gesunden und bei nicht-sphärocytärer, hämolytischer Pyruvatkinase-Mangel-Anämie
Klin. Wschr. 43 (1965) 1311
87. WOLF, R. O., L. M. TAUSSIG: Human amniotic fluid iso-amylases. Functional development of fetal pancreas and

salivary glands

Obstet. and Gynec. 41 (1973) 337

Literatureempfehlung zum Thema

1. Amniotic Fluid

Research and Clinical Application

D. V. I. Fairweather and T. K. A. B. Eskes

second edition Excerpta Medica 1978

2. Amniotic Fluid

Physiology, Biochemistry and Clinical Chemistry

S. Natelson, A. Scommegna and M. B. Epstein 1974

3. Amniotic Fluid

Sandler Dekker 1980

4. Current Developments in Perinatology

The fetus, placenta, and newborn

F. P. Zuspan 1977

5. Perinatal Medicine

Management of the high risk fetus and neonate

R. J. Bolognese, R. H. Schwarz 1977

9. Lebenslauf

Name	Ralf Meraner
Geburtstag	01.04.1952 in Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
Schulbildung	Abitur (1963 - 1971)
Berufliche Tätigkeiten	Kaufmann im Groß- und Außenhandel 1971 - 1973
	Nachschubbuchführer-Bundeswehr 1973 - 1975
	3 Semester Pharmazie-Berufsfachschu- le 1975 - 1977
	Studium der Humanmedizin FU-Berlin 1976/77 - 1983
	seit 01.07.1983 Stationsarzt der Station H3B Abtlg. Traumatologie Stadtkrankenhaus Wolfsburg

10. Danksagung

Für das Thema dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. G. Bacigalupo. Betonen möchte ich seine stets hilfreiche und freundliche Unterstützung.

Herrn Dipl. math. J. Gesche danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Der Hebamme Maria sei für ihre gute Kooperation bei den ambulant durchgeführten Amniozentesen gedankt.

Schließlich gebührt all denen Dank, die mit zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

